

PCT

ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/22023 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Mai 1999 (06.05.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06863		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, DE, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)		
(30) Prioritätsdaten: 197 47 731.3 29. Oktober 1997 (29.10.97) DE		
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): MIRA DIAGNOSTICA GMBH [DE/DE]; Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE).		
(72) Erfinder; und		Veröffentlicht
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): LEISER, Matthias [DE/DE]; Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE). EP-PING, Bernd [DE/DE]; Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE).		<i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).		

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING MICRO-ORGANISMS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON MIKROORGANISMEN

(57) Abstract

A method for identifying micro-organisms belonging to various taxes of micro-organisms, as specified in table 1, in a sample which can contain a plurality of various micro-organisms of said taxes, by means of nucleic acid hybridization techniques using oligo nucleotides with sequence ID. No. 1-62 as probes in order to obtain a hybridization result, whereby at least one hybridization result is obtained for each micro-organism to be identified.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zum Nachweis von in Tabelle 1 angegeben Mikroorganismen verschiedener Taxa in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen dieser Taxa enthalten kann, mittels Nucleinsäurehybridisierungstechniken bei Verwendung von Oligonukleotiden mit der Seq. ID. No 1 bis 62 als Sonden, unter Erhalt eines Hybridisierungsergebnisses, wobei für jeden nachzuweisenden Mikroorganismus mindestens ein Hybridisierungsergebnis erhalten wird.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Leitland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen verschiedener Taxa in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen enthalten kann.

Die Identifikation von Mikroorganismen aus komplexen Proben (die mehrere unterschiedliche Keime im Gemisch enthalten) ist eine wichtige und schwierige Aufgabe, zum Beispiel bei Hygieneuntersuchungen und anderen Vorhaben.

Die WO-A-97/41253 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von einem Mikroorganismus oder mehreren Mikroorganismen in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen enthält, mittels molekularbiologischer Techniken, wie Amplifikationsreaktionen, wobei mindestens eine Hybridisierungssonde (A), die konservierte Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus(men) anzuzeigen in der Lage ist und mindestens eine Hybridisierungssonde (B), die weniger konservierte Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus(men) anzuzeigen in der Lage ist, zu der Probe gegeben werden, mit der Maßgabe, daß pro interessierendem Mikroorganismus mindestens eine Hybridisierungssonde des Typs (A) und des Typs (B) vorhanden sein muß, sich die Probe in einem hybridisierungsfähigen Zustand befindet und durch ein entstehendes Hybridisierungsmuster eine Identifikation des oder der interessierenden Mikroorganismen erfolgt.

Nachteilig an der geschilderten Methode ist, daß viele Bakterienarten aufgrund zu geringer Sequenzvariationen im Bereich der ribosomalen Gene, speziell der 16S rDNA, häufig Kreuzreaktionen mit den gewählten Oligonucleotid-Sequenzen zeigen und demzufolge nicht voneinander differenziert werden können.

WO-A-96/00298 betrifft ein Verfahren zur simultanen Detektion und Identifikation und Differentiation von Eu-Bakterien unter Verwendung eines Hybridisationassays. Dabei werden im wesentlichen 16S-23S rRNA Spacerbereiche amplifiziert und die erhaltenen Nucleinsäuren mit Sonden spezifischer Art hybridisiert. Der Nachteil dieser Methode beruht darin, daß der 16S-23S-Spacerbereich bei vielen Mikroorganismen kein funktioneller Abschnitt ist und deswegen keinem oder nur einem sehr geringen Selektionsdruck unterliegt. Als Folge lassen sich selbst innerhalb einer Art in den verschiedenen rDNA-Operonen Unterschiede in den Längen und Sequenzen der Spacers nachweisen, die häufig keinen Bezug zu phylogenetischen Zusammenhängen erkennen lassen (T. Hain: Molekulare Identifizierung von Streptomyzeten über Sequenzanalyse der Spacersbereiche ribosomaler RNA-Operone: Diplomarbeit Naturwiss. Fak. Der TU Carolo Wilhemina Braunschweig, 1995, 63 S.) und deshalb für diagnostische Fragestellungen ungeeignet erscheinen. Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß die Spacerssequenzen bisher nur bei wenigen Arten untersucht sind und es demzufolge für sie im Unterschied zu den 16S rDNA-Sequenzen noch keine ausreichenden Sequenzdatenbanken gibt. Dies bedeutet, daß bislang nicht genügend Sequenzinformationen vorliegen, um Nachweismethoden auf der Basis der Spacersregionen für die wichtigsten Bakterienarten zu entwickeln, selbst wenn der erstgenannte Nachteil beherrschbar wäre.

EP-A-0 497 464 A1 betrifft einen mikrobiologischen Schnellassay durch in situ Hybridisation in wäßriger Lösung. Dabei werden die Mikroorganismen zunächst mit

- 3 -

einer wäßrigen Zusammensetzung in Kontakt gebracht, wodurch die Mikroorganismen zum einen fixiert und zum anderen die Zellwände für Oligonucleotide durchlässig gemacht werden. Danach werden markierte Nucleinsäuresonden zugegeben, die mit bestimmten Nucleotidsequenzen in der zellulären Nucleinsäure komplementär sind, so daß sich eine Hybridisierungsreaktion einstellt, gefolgt von einer Detektion der hybridisierten Nucleinsäure. Dieses Verfahren betrifft eine In-situ-Hybridisierungsmethode. Die Erkenntnisse und Methoden sind auf in-vitro-Analysen, wie sie bei PCR- und Hybridisierungstests in Reaktionsgefäß en mit isolierter Ziel-Nucleinsäure üblich sind, nicht übertragbar. In-situ-Methoden haben den Nachteil, daß Probenvorbereitung und/oder Testdurchführung, insbesondere was den Detektionsteil betrifft, sehr komplizierte und teure Geräte erfordert.

US-A-5,614,361 betrifft ein Verfahren zur Charakterisierung eines unbekannten Organismus in einer Probe durch Bestimmung der Position eines Teils oder der gesamten konservierten DNA des betreffenden Organismus relativ zur Position von Restriktionsendonuclease-Spaltungsstellen in der DNA, wobei sich ein für einen bestimmten Mikroorganismus charakteristisches Muster einstellt. Nachteilig an diesem Verfahren ist, daß die Identifizierung von Organismen anhand ihrer DNA-Spaltmuster nach Abbau durch Restriktionsendonucleasen sehr aufwendig ist und die Reinkultur der zu analysierenden Organismen verlangt.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht mithin darin, zunächst die genannten Nachteile des Standes der Technik zu vermeiden und darüber hinaus auch dem Anwender ein Verfahren an die Hand zu geben, daß es ihm nach Maßgabe seiner analytischen Probleme erlaubt, ein Assay-Verfahren zusammenzustellen, daß auf die spezifischen Bedürfnisse eines Analysenproblems zugeschnitten ist.

- 4 -

Gelöst wird dieses Problem durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1. Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Überraschenderweise gewährleisten die erfindungsgemäßen Oligonucleotide mit den Seq. ID. Nr. 1 - 62 gemäß Sequenzprotokoll eine praxisgerechte Bakterien-identifikation.

Die variablen Regionen ribosomaler Gensequenzen sind häufig benutzt worden, um phylogenetische Zusammenhänge zwischen unterschiedlichen Arten herzustellen und DNA-Sonden bzw. PCR-Startoligonucleotide für diagnostische oder analytische Zwecke zu entwerfen und zu verwenden.

Allerdings hat sich hierbei mittlerweile in der Fachwelt die Anschauung durchgesetzt, daß die Sequenzen insbesondere der kleinen ribosomalen RNA (16S rDNA von Prokaryonten) wenig geeignet sind, um enger verwandte Bakterienarten geschweige denn -stämme hinreichend voneinander unterscheiden zu können. So schreiben z. B. Barry et al. (The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria, PCR Methods and Applications 1 (1991) 51 - 56), daß zu wenig Sequenzvariationen zwischen den 16S rRNA-Genen von eng verwandten Mikroorganismen beobachtet werden. Cilia et al. (Sequence heterogeneties among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level, Molec. Biol. Evol. 13 (1996) 451 - 461) stellen fest, daß rRNA-Sequenzen der kleinen Untereinheit nicht adäquat geeignet sind, um phylogenetische Beziehungen zwischen eng verwandten Arten, geschweige denn verschiedenen Stämmen innerhalb einer Art zu analysieren. Sie zitieren hierzu weitere Autoren (Ash et al., Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences, Lett. Appl. Microbiol. 13 (1991) 202 - 206; Rössler et al., 1991; Ruimy et al., 1994). Ähnlich äußern sich Berthier und

- 5 -

Ehrlich (Rapid species identification with two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. Fems Microbiol. Letters 161 (1998) 97 - 106). rRNA-Sonden eng verwandter Arten können aufgrund der hohen Ähnlichkeit der rRNA-Sequenzen nicht verwendet werden. Sie zitieren hierzu weiterhin Fox et al. (How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identify, Int. J. Bacteriol. 42 (1992) 166 - 170), Schleifer et al. (Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria, Int. Dairy J. 5 (1995) 1081 - 1094) und Cerk et al. (Lactobacillus paraplanitarum sp. Nov., A new species related to Lactobacillus plantarum, Int. J. Syst. Bacteriol. 46 (1996) 595 - 598.

Das erfindungsgemäß Verfahren erlaubt auch eine simultane Erfassung und simultanen Nachweis von Mikroorganismen verschiedener Taxa in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen enthalten kann. Unter dem Begriff "Taxon" werden Familien, Gattungen, Arten und Unterarten von Mikroorganismen verstanden.

Basis für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Anwendung von Nucleinsäurehybridisierungstechniken. Dabei werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die mit DNA oder RNA, die indikativ für Mikroorganismen sind und aus den nachzuweisenden Organismen stammen, in Wechselwirkung treten. Ist die Konzentration an nachzuweisender Nucleinsäure zu gering, können gegebenenfalls Amplifikationstechniken zur Erhöhung der Konzentration eingesetzt werden. Durch Hybridisierung der Sonden mit der DNA oder RNA wird ein Hybridisierungsergebnis erhalten. Erfindungsgemäß ist dabei wesentlich, daß für jeden nachzuweisenden Mikroorganismus zunächst mindestens ein Hybridisierungsergebnis erhalten wird. Dies kann insbesondere durch das in der WO-A-97/41253 beschriebene Verfahren

erfolgen. Auf den Gegenstand der WO-A-97/41253 wird ausdrücklich Bezug genommen.

Als Sonden werden erfindungsgemäß Oligonucleotide eingesetzt, die einer der im Sequenzprotokoll mit den Seq. Id. Nr. 1 - 62 ausgewiesenen Sequenzen besitzt. Dabei kann erfindungsgemäß sowohl das gesamte Ensemble der Oligonucleotide mit den Nr. 1 - 62 eingesetzt werden oder aber der Anwender sucht die zu seinem Nachweisproblem zugehörigen Oligonucleotide mit der Maßgabe der Zuordnung gemäß Tabelle 1 aus. Erfindungswesentlich ist, daß die Tabelle 1 angibt, welche der genannten Oligonucleotidsequenzen indikativ für das betreffende Taxon ist.

Tabelle 1: Experimentelle Untersuchungen artifizieller Gemische

Diagnostische Fragestellung: Familien-, Gattungs-, Gruppenebene	Oligo- nucleotid 1	Oligo- nucleotid 2	Oligo- nucleotid 3	Oligo- nucleotid4
Acinetobacter spp. ¹⁾	Ac.an1r	P		
Acinetobacter spp. ²⁾	Ac.xx1r	P		
Aeromonas spp. ³⁾	Ae.calr	P		
Alcaligenes spp. ⁴⁾	Al.xx1r	P	Al.xx2r	P
Campylobacter spp. ⁵⁾	Ca.jelr	P		
Listeria spp.	Li.mo2r	P	Ba.la gr1r	P
Enterobakterien ⁶⁾	Gammalr			
Diagnostische Fragestellung: Artenebene	Oligo- nucleotid 1	Oligo- nucleotid 2	Oligo- nucleotid 3	Oligo- nucleotid4
Acinetobacter junii	Ac.calr	P	En.aelr	P
Aeromonas hydrophilia	Ae.hy1r	P	Ae.hy2r	P
Aeromonas salmonicida	Ae.salr	P	Ed.talr	P
Aeromonas schubertii	Ae.sclr	P	Pr.vu3r	P
Alcaligenes faecalis	Al.fa2r	P		
Bacillus cereus	Ba.ce gr1r	P	Ba.ce gr2r	P
			Ba.ce/stp1 r	P
Bacillus subtilis	Ba.su2r	P		
Brochothrix thermosphacta	Br.th3r	P	Br.th2r	P

- 7 -

Carnobacterium divergens	Ca.dilr	P						
Carnobacterium galinarum	Ca.pi/galr	P						
Carnobacterium piscicola	Ca.pi/galr	P						
Citrobacter freundii	Ci.fr2r	P	Ci.fr3r	P	Ci.fr5r	P	Sa.ty2r	P
Clostridium perfringens	Cl.pe1r	P						
Edwardsiella tarda	Ed.ta1r	P	Gamma1r	P				
Enterobacter aerogenes	En.ae1r	P	Gamma1r	P				
Enterobacter cloacae	En.cl3r	P	Sa.ty2r	P	Gamma1r	P		
Escherichia coli/S. spp.	Es.co2r	P	Es.co3r	P	Gamma1r	P		
Flavobacterium breve	Fl.br2r	P	En.cl3r	P	Fl.br1r	P		
Flavobacterium odoratum	Fl.od1r	P						
Hafnia alvei	Ha.al2r	P						
Klebsiella oxytoca	Kl.ox3r	P	Gamma1	P				
Lactobacillus paracasei	La.pa1r	P	La.pa2r	P				
Microbacterium lacticum	Mi.la2r	P	Mi.xx1r	P				
Moraxella bovis	Mo.bo1r	P	Mo.ca2r	P				
Pediococcus damnosus	Pe.da/pa1r	P						
Plesiomonas shigelloides	Pl.sh1r	P						
Pseudomonas aeruginosa	Ps.ae1r	P						
Ralstonia pickettii	Ra.pi1r	P	Ra.pi2r	P				
Salmonella Typhimurium	Sa.ty2r	P	Sa.xx5r	P				
Serratia marcescens	Se.ma1r	P						
Staphylococcus aureus	St.au2r pre	P	St.au/ha1r	P	Ba.ce/Stpl r	P		
Streptococcus agalactiae	Str.ag1r	P	Br.th2r	P				
Vibrio vulnificus	Vi.vu1r	P	Vi.vu2r	P				
Yersinia enterocolitica	Ye.en1r	P	Gamma1r	P				

1) Acinetobacter anitra (DSM 30008), Acinetobacter baumannii (DSM 30007), Acinetobacter haemolyticus

2) Acinetobacter baumannii (DSM 30007), Acinetobacter baumannii (DSM 1139), Acinetobacter calcoaceticus (DSM 30006), Acinetobacter haemolyticus

3) Aeromonas caviae, Aeromonas enteropelogenes

4) Alcaligenes denitrificans, Alcaligenes faecalis

5) Campylobacter Spezies

6) Citrobacter freundii, Edwardsiella tarda, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Escherichia coli/S.spp., Hafnia alvei, Klebsiella oxytoca, Plesiomonas shigelloides, Salmonella Typhimurium, Serratia marcescens, Vibrio vulnificus, Yersinia enterocolitica

P bedeutet "positiv"

Die Tabelle 2 stellt die Konkordanz zwischen den Oligonucleotiden und deren Bezeichnung gemäß Tabelle 1 her.

Als Starteroligonucleotid wurde 10-30f mit der Sequenz
GAG TTT GAT CCT GGC TCA G verwendet (Seq. Id. Nr. 62).

Tabelle 2

ID-Nr.	Abkürzung	Sequenz 5'-3'
1.	Ac.an1r	CAC TAT CTC TAG GTA TTA ACT AAA GT
2.	Ac.calr	AGG TAT TAA CTT CAG TAG CC
3.	Ac.xx1r	CGA GTA ACG TCC ACT ATC TG
4.	Ae.calr	CCA GCA GAT ATT AGC TAC TG
5.	Ae.hy 1r	TTG ATA CGT ATT AGG CAT CA
6.	Ae.hy 2r	GTT GAT ACG TAT TAG GCA TCA
7.	Ae.salr	TTG ACA CGT ATT AGG CGC
8.	Ae.sclr	TGG CAG GTA TTA ACC ACC A
9.	Al.fa2r	TCT CGT ATT AGG AGA TAC CTT
10.	Al.xx1r	TAC TGG GCA CGT TCC GAT AT
11.	Al.xx2r	ATA TCG GCC GCT CCA ATA GT
12.	Ba.ce gr2r	TAC CGT CAA GGT GCC AGC T
13.	Ba.ce/stplr	CCA TGC GGT TCA AAA TGT T
14.	Ba.ce gr1r	CCA GCT TAT TCA ACT AGC
15.	Ba.la gr1r	CGG AAA CCC TCC AAC A
16.	Ba.su2r	ACC GCC CTA TTC GAA CGG T
17.	Br.th2r	AGC GCG GGT CCA TCT CAC
18.	Br.th3r	CAT CTT ATG ATG TTC AGC ACA
19.	Ca.dilr	CC ATG CGG TCA CTT GAA AT
20.	Ca.je1r	AG TGT CAT CCT CCA
21.	Ca.je2r	ATT CTT CCC TAA GAA AAG GAG
22.	Ca.je3r	CGT CAG AAT TCT TCC CTA AG
23.	Ca.pi/galr	TCA TGC GAT TCC TGA AAC
24.	Ci.fr2r	GT AAC GTC AAT GGC TGA GGT
25.	Ci.fr3r	TT CTC TGG ATG TCA AGA GT
26.	Ci.fr5r	CC AAG GCA TCT CTG CCA AG
27.	Cl.pe1r	CC TTT GGT TGA ATG ATG
28.	Ed.talr	CC CGT ATC TCT ACA GGA
29.	En.ae2r	GAG TAA CGT CAA TCG CCA AG

ID-Nr.	Abkürzung	Sequenz 5'-3'
30.	En.cl3r	AG CCG TTA CCC CAC CTA CT
31.	Es.co2r	GCA AAG GTA TTA ACT TTA CTC
32.	Es.co3r	GTA ACG TCA ATG AGC AAA GG
33.	Fl.br1r	TA CGC ATG CCT ATC CTA CT
34.	Fl.br2r	TG GTA CCT TCA GCT ACT TA
35.	Fl.od1r	CCA TGG AGC ATT AAT CCG AA
36.	Gamma 1	AAG GTC CCC CTC TTT GGT
37.	Ha.al2r	GT AAC GTC AAT CAC TGT GG
38.	Kl.ox3r	GGT AAC GTC AAT GAA TAA GGT
39.	La.pa1r	CAA CAG TTA CTC TGC CGA CCA
40.	La.pa2r	TTA CGC CAT CTT TCA GCC A
41.	Li.mo2 r	CAA GCA GTT ACT CTT AT
42.	Mi.la2r	AT TTC TGG CCC GTT CTC GT
43.	Mi.xx1r	ATT TCT GGC CCG TTC TCG
44.	Mo.bolr	CTA TCT CTA GCG AAT TCT TGG
45.	Mo.ca2r	GGT AAC GTC AGG GCT TAT G
46.	Pe.da/pa1r	TGG ATA CCG TCA CTG CAT GAG
47.	Pl.sh1r	CCA CTA GGT ATT AAC TAG TGA
48.	Pr.vu3r	AAC CCC TGC TTT GGT CCG TA
49.	Ps.ae1r	CCG TAC TCT AGC TCA GT
50.	Ra.pi1r	GGT ATT AAC CAG AGC CAT
51.	Ra.pi2r	TAG CCG TGC AGT CAC CA
52.	Sa.ty2 r	CTG CGG TTA TTA ACC ACA ACA
53.	Sa.xx5r	ACC AAT CCA TCT CTG GAT TC
54.	Se.malr	ATG AGC GTA TTA AGC TCA CCA
55.	St.au/hal1r	GGC TCT ATC TCT AGA GTT G
56.	St.au2r pre	GTG CAC AGT TAC TTA CAC ATA
57.	Str.ag1r	ATT TTC CAC TCC TAC CAA C
58.	Str.ag3r	CCG TTT CCA AAG CGT ACA AT
59.	Vi.vu1r	GCT AAC GTC AAA TGA TAG TGC
60.	Vi.vu2r	GCT AAC GTC AAA TGA TGC CGC
61.	Ye.en1r	AAC AAC GTA TTA AGT TATTGG
62.	10-30f	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G

Vorzugsweise wird erfindungsgemäß eine weitere Hybridisierung mittels mindestens einer Hybridisierungssonde durchgeführt, die von der ersten Hybridisierungssonde unterschiedlich ist, aber auch eine der Seq. ID Nr. 1 - 61 aufweist. Dies führt dann entweder zum Auftreten oder zum Ausbleiben von Kreuzreaktionen. Diese

- 10 -

Information kann dann zur eindeutigen Identifikation der Mikroorganismen oder eines Mikroorganismenensembles in einer Probe heranzogen werden.

Vorteilhaft am erfindungsgemäßen Verfahren ist mithin die Möglichkeit, in eindeutiger Weise bestimmte Mikroorganismen allein oder ein Ensemble von Mikroorganismen simultan zu bestimmen. Die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse kann dann beispielsweise durch eine zweidimensionale Auftragung der Hybridisierungsergebnisse erfolgen. Es ergibt sich dabei ein bestimmtes Hybridisierungsmuster, welches indikativ für ein bestimmtes Mikroorganismenensemble ist. Solche Muster können z.B. in Datenbanken abgelegt werden. Insbesondere bei Reihenuntersuchungen können solche Muster abgefragt werden und zur schnellen und sicheren Identifizierung eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich mithin insbesondere für automatisierbare Untersuchungen.

Vorzugsweise erfolgt eine Detektion der Kreuzreaktion räumlich und/oder zeitlich oder durch verschiedene Markierungen der Sonden.

Vorzugsweise kann die räumliche Anordnung der Hybridisierungsergebnisse auf einem Substrat erfolgen. Als Substrate kommen beliebige, in der Molekularbiologie gebräuchliche Trägersysteme in Betracht, wie beispielsweise Mikrotiterplatten, Blotting-Papiere, Spezialmembranen oder DNA-Chips.

Eine zeitliche Auflösung der Kreuzreaktion bietet sich bei Durchflußverfahren an. Es werden der Probe sequentiell Hybridisierungssonden zugesetzt und deren Wechselwirkung mit in der Probe enthaltener Nucleinsäure untersucht.

Alternativ kann auch bei einer statischen Analyse durch Wahl geeigneter Markierungsreagenzien eine zeitliche Aufnahme der Hybridisierungsergebnisse in Mustern erfolgen. Beispielsweise ist dies möglich durch Verwendung von Farbstoffen

- 11 -

unterschiedlicher spektraler Charakteristika oder von Fluoreszenzmarkern mit kurzer, unterschiedlicher oder zeitversetzter Lebensdauer. Auch die in zeitlicher Abhängigkeit aufgenommenen Hybridisierungsmuster können in Datenbanken abgelegt werden und dann bei Abgleich mit einer aktuellen Probe als Hinweis für den mikrobiologischen Zustand dieser Probe dienen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind mithin auch Oligonucleotide mit denen in Seq. Id. Nr. 1 - 61 wiedergegebenen Sequenzen.

Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide können insbesondere in Form von Kits zusammen mit Hilfsmitteln zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens angeboten werden. In vorteilhafter Weise sind dabei die Oligonucleotide auf einem Substrat angeordnet. Die Anordnung kann insbesondere in festen Zuordnungen erfolgen, so daß bei positiver Hybridisierung eine Detektion auf einem Substrat jeweils an einer standardisierten gleichen Stelle erscheint, was eine Automatisierung der Auswertung erleichtert.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Voranreicherung und Extraktion der Mikroorganismen

Zur Voranreicherung werden 100 ml des Probenmaterials mit 300 ml nicht selektivem Flüssigmedium (CASO-Bouillon), versetzt und für 4 - 18 h im Brutschrank bei 28 - 37°C (abhängig von den Zielorganismen) bebrütet. Anschließend erfolgt die Entnahme von 1,5 ml dieser Flüssiganreicherung für die nachfolgende Extraktion der DNA. Diese Lösung wird für 2 min bei 8000 g

- 12 -

zentrifugiert, der entstandene Überstand verworfen und das Sediment (Pellet) in 100 µl Puffer 1 (2 mg/ml Lysozym, 20 µg/ml Lysostaphin, 100 mM Tris/HCl pH 7,2 - 7,4, 2 mM CaCl₂, 4 % Saccharose-Lösung, Proteinase K-Lösung (20 mg/ml H₂O)) resuspendiert. Danach erfolgt die Zugabe von 20 µl RNase A-Lösung (20 mg/ml in Natriumacetatpuffer, pH 5,2) und Vermischung der Suspension auf dem Schüttler. Im Anschluß daran wird das Gemisch für 10 min bei 60°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend werden dieser Lösung 100 µl Puffer 2 (10% SDS-Lösung, 1,5 mM EDTA) zugegeben und nochmals für 10 min bei 60°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Reinigung der DNA erfolgt mittels DNA-Reinigungssäulen (QIAamp von QIAGEN). Hierzu wird die Lösung mit 200 µl Bindungspuffer (AL-Puffer QIAGEN) und 200 µl absolutem Alkohol versetzt und auf dem Schüttler gut durchmischt. Das gesamte Volumen wird anschließend auf eine Reinigungssäule (in einem Leertube fixiert) gegeben und für 1min bei 8000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wird verworfen, die Reinigungssäule in ein neues Leertube gegeben und mit 500 µl Waschpuffer (AW-Puffer von QIAGEN) beschickt. Es folgt eine erneute Zentrifugation für 1min bei 8000 g und Verwerfen des entstandenen Zentrifugates. Danach werden 200 µl H₂O (auf 60°C vorgewärmt) zugegeben und für 1min bei 8000 g zentrifugiert. Die auf diesem Wege eluierte DNA kann nun für die nachfolgende Identifizierung mittels PCR herangezogen werden.

Identifizierung der Mikroorganismen mittels PCR

Zur Durchführung der PCR werden folgende Reaktionskomponenten miteinander vermischt:

- 13 -

10 x PCR-Puffer (0,1 % Tween, 660 mM Tris/HCl pH 8,8, 166 mM (NH₄)₂SO₄

5,0 µl

MgCl₂ (25 mM) 5,0 µl

dNTP's (je 2 mM) 5,0 µl

Taq-Polymerase (5 U/µl) 0,2 µl

DNA-Template (0,2 ng/µl) 5,0 µl

Primer A (30 pmol) 1,0 µl

Primer B (30 pmol) 1,0 µl

H₂O 27,8 µl

Die Amplifikation der Ziel-DNA (Target-DNA) erfolgt in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700 von Perkin Elmer) mit vorzugsweise beheiztem Deckel. Hierbei wird die DNA zuerst für 5 min bei 94°C denaturiert und anschließend für 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

30 sec 94°C Zyklus-Denaturierung

15 sec 56°C Primer-Hybridisierung („Annealing“)

20 sec 72°C Elongation („Extension“)

Zum Abschluß des PCR-Programmes erfolgt eine nochmalige Elongation bei 72°C für 1min.

Die Auswahl der Starteroligonucleotide (Primer) bestimmt letztendlich die Taxonspezifität der PCR-Amplifikation und ermöglicht somit die Identifizierung der in der Probe vorhandenen Bakterien. Hierbei kann der Primer A sowohl zur taxonspezifischen Hybridisierung an einen variablen Bereich der Ziel-DNA, als auch zur breitbandspezifischen Hybridisierung an einen in allen Bakterien homologen Sequenzbereich dienen. Hingegen hybridisiert Primer B an einen artspezifischen Sequenzbereich der Bakterien-DNA und ist somit der entscheidende Faktor zur Bestimmung der Spezies/Gattung oder Gruppe. Für jeden

nachzuweisenden Organismus werden die jeweils benötigten Starteroligonucleotide A und B benötigt.

Beispiel 2: Milch

Bei den zum Nachweis in Milch relevanten Bakterien handelt es sich in erster Linie um folgende Gattungen/Spezies:

E. coli

Campylobacter spezies

Listeria spezies

Salmonella spezies

Zur Identifizierung der oben genannten Bakterien werden die nachfolgend aufgeführten DNA-Starteroligonucleotide herangezogen:

Gattung/Spezies	Starteroligonucleotid A	Starteroligonucleotid B
<i>E.coli</i>	10-30f (Seq. ID. Nr. 62)	Es.co3r (ID-Nr. 32)
<i>Campylobacter spezies</i>	10-30f	Ca.je1r (ID-Nr. 20)
<i>Listeria spezies</i>	10-30f	Li.mo2r (ID-Nr. 41)
<i>Salmonella spezies</i>	10-30f	Sa.xx5r (ID-Nr. 53)

Beispiel 3: Wasser

Bei den zum Nachweis in Wasser relevanten Bakterien handelt es sich in erster Linie um folgende Gattungen/Spezies:

E.coli

Enterobacter aerogenes

Klebsiella oxytoca

Pseudomonas aeruginosa

Enterobakterien⁶⁾

Zur Identifizierung der oben genannten Bakterien werden die nachfolgend aufgeführten DNA-Starteroligonucleotide herangezogen:

Gattung/Spezies	Starteroligonucleotid A	Starteroligonucleotid B
E.coli	10-30f	Es.co3r (ID-Nr. 32)
Enterobacter aerogenes	10-30f	En.ae2r (ID-Nr. 29)
Klebsiella oxytoca	10-30f	Kl.ox3r (ID-Nr. 38)
Pseudomonas aeruginosa	10-30f	Ps.ae1r (ID-Nr. 49)
Enterobakterien ⁶⁾	10-30f	Gamma1r (ID-Nr.36)

⁶⁾ Citrobacter freundii, Edwardsiella tarda, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Escherichia coli/S.spp., Hafnia alvei, Klebsiella oxytoca, Plesiomonas shigelloides, Salmonella Typhimurium, Serratia marcescens, Vibrio vulnificus, Yersinia enterocolitica

Beispiel 4: Für unterschiedliche in der Praxis vorkommende Proben wurden artifizielle Gemische im Experiment untersucht (Tabelle 2)

Häufige Fragestellungen in der Praxis erfordern vielfach eine Identifizierung von ganz bestimmten Keimen oder eines reduzierten Artenspektrums. Dies liegt in den ganz unterschiedlichen Wachstumsanforderungen der Bakterien begründet, das heißt, daß nicht alle Bakterienarten gleichsam in unterschiedlichen Proben wachsen oder leben können. Hieraus ergibt sich für Untersuchungen an Proben häufig die Bestimmung ganz bestimmter Bakterienarten, -gattungen, oder -gruppen (Beispiele 2 und 3). In Tabelle 1 sind Identifizierungen von Organismen dargestellt, die in ganz unterschiedlichen artifiziellen Gemischen hinsichtlich dieser Prämisse geprüft und einwandfrei bestimmt werden konnten.

Zur Identifizierung werden die Amplifikate der PCR-Reaktion auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und bei 5 - 6 V/cm Elektrodenabstand im elektrischen Feld durch Horizontalgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wird das Agarosegel für 10min in einer 0,5 µg/ml Ethidiumbromid/TAE-Puffer-Lösung gefärbt und unter einem UV-Transilluminator bei 254 nm photodokumentiert.

Die entwickelten Starteroligonucleotide weisen die genannten Bakterien auch in Mischproben hochspezifisch nach. Sofern eine Probe eine oder mehrere der gesuchten Bakterien enthält, wird dies durch eine Bande mit definierter Größe auf dem Elektrophoresegel sichtbar.

Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von in Tabelle 1 angegebenen Mikroorganismen verschiedener Taxa in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen dieser Taxa enthalten kann, mittels Nucleinsäurehybridisierungstechniken bei Verwendung von Oligonucleotiden mit der Seq. ID. No 1 bis 62 als Sonden, unter Erhalt eines Hybridisierungsergebnisses, wobei für jeden nachzuweisenden Mikroorganismus mindestens ein Hybridisierungsergebnis erhalten wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei mittels einer Kreuzreaktion durch Zugabe mindestens einer zweiten von der ersten Sonde verschiedenen Hybridisierungssonde, die ausgewählt ist aus der Gruppe der Oligonucleotide mit den Seq. ID No 1 bis 62 nach Maßgabe der in Tabelle 1 erfolgten Zuordnung, eine eindeutige Identifizierung des nachzuweisenden Mikroorganismus oder Gruppe von Mikroorganismen erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei eine Detektion der Kreuzreaktion räumlich und/oder zeitlich aufgelöst erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion durch Verwendung unterschiedlicher Markierungen der Hybridisierungssonden erfolgt.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungsergebnisse auf einem Substrat angeordnet sind.

- 18 -

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die auf dem Substrat angeordneten Hybridisierungsergebnisse ein für die nachzuweisenden Mikroorganismen charakteristisches Muster ergeben.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Hybridisierungsergebnis in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das zeitlich aufgenommene Hybridisierungsmuster spezifisch für die nachzuweisenden Mikroorganismen oder ein Ensemble von Mikroorganismen ist.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Hybridisierungsmuster durch Aufnahme von Hybridisierungsergebnissen erstellt wird, die durch Sonden mit unterschiedlicher Markierung erstellt werden.
10. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat ein DNA-Chip ist.
11. Substrat mit mindestens einer Art von Oligonucleotiden gemäß Seq. ID. No 1 - 61.
12. Substrat nach Anspruch 11, wobei das Substrat als DNA-Chip ausgebildet ist.

- 19 -

13. Kit enthaltend mindestens ein Oligonucleotid mit der Seq. Id. No 1 - 62, ggf. auf mindestens einem Substrat nach einem der Ansprüche 11 oder 12 sowie Hilfsmittel zu Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
14. Oligonucleotide mit den in Seq. Id. Nr. 1 - 61 wiedergegebenen Sequenzen.

DE 196 16 750 A1

File 351:Derwent WPI 1963-2000/UD,UM &UP=200059
(c) 2002 Derwent Info Ltd

1/23/1
DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2002 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

011560757
WPI Acc No: 1997-537238/ 199750

XRAM Acc No: C97-171982

Nucleic acid assay for detecting microorganisms in mixture - using combination of oligonucleotide(s) complementary to highly conserved and less conserved sequences

Patent Assignee: NEWLAB DIAGNOSTIC SYSTEMS GMBH (NEWL-N); MIRA DIAGNOSTICA GMBH (MIRA-N)

Number of Countries: 068 Number of Patents: 003

Abstract (Basic): DE 19616750 A

A method for detecting microorganisms of interest in a sample that may contain a mixture of microorganisms by molecular-biology techniques, e.g. amplification reactions, is claimed, where at least one hybridisation probe (A) capable of detecting conserved nucleic acid sequences in the microorganism(s) of interest and at least one hybridisation probe (B) capable of detecting less conserved nucleic acid sequences in the microorganism(s) of interest are added to the sample under hybridisation conditions and identifying the microorganism(s) of interest on the basis of the resulting hybridisation pattern, provided that at least one probe of type A and B must be used for each microorganism of interest.

ADVANTAGE - It is not necessary to prepare pure cultures of the individual microorganisms.

Dwg.0/0

Title Terms: NUCLEIC; ACID; ASSAY; DETECT; MICROORGANISM; MIXTURE; COMBINATION; OLIGO; NUCLEOTIDE; COMPLEMENTARY; HIGH; CONSERVE; LESS; CONSERVE; SEQUENCE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12Q-001/68



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 196 16 750 A 1

⑮ Int. Cl. 6:
C 12 Q 1/68



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Aktenzeichen: 196 16 750.7
⑯ Anmeldetag: 26. 4. 96
⑯ Offenlegungstag: 6. 11. 97

⑯ Anmelder:
NewLab Diagnostic Systems GmbH, 40699 Erkrath,
DE

⑯ Vertreter:
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln

⑯ Erfinder:
Leiser, Robert-Matthias, Dr., 42697 Solingen, DE;
Sperveslage, Jens, 40699 Erkrath, DE

⑯ Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen in Gemischen

⑯ Beschrieben wird ein Verfahren, das den Nachweis und die Identifikation von Mikroorganismen ermöglicht, die sich in einer Mischprobe befinden, ohne daß für die Identifikation eine Trennung der Keime z. B. durch Einzelkolonie-Passagen notwendig ist. In diesem Verfahren werden molekularbiologische Techniken angewendet. Durch Hybridisierung mit Sonden, die unterschiedlich konservierte Abschnitte der Erbinformation der betreffenden Mikroorganismen erkennen können, wird die Detektion und Differenzierung der Mikroorganismen im Gemisch erreicht. Hierbei wird eine Kombination aus allgemeiner Keimbestimmung auf Basis hochkonservierter Sequenzabschnitte und individuell definierter Spezifizierung durch weniger konservierte Sequenzabschnitte vorgenommen. Vorzugsweise wird für hinreichende Sensitivität des Nachweises eine Amplifikation des Nucleinsäureabschnitts, z. B. mittels PCR, durchgeführt.

196 16 750 A 1

DE 196 16 750 A 1

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von interessierenden Mikroorganismen in einer den oder die interessierenden Mikroorganismus(men) enthaltenen Probe, in der ein Gemisch von Mikroorganismen vorliegen kann, mittels molekularbiologischer Techniken, wie Amplifikationsreaktionen.

Die Identifikation von Mikroorganismen aus komplexen Proben (die mehrere unterschiedliche Keime im Gemisch enthalten) ist eine wichtige und schwierige Aufgabe z. B. bei Hygieneuntersuchungen und anderen Vorhaben.

Stand der Technik ist hier die Kultivierung der Mikroorganismen, ihre Selektivanreicherung auf speziellen Nährmedien, die Einzelkoloniepassage und schließlich die taxonomische Identifikation unter Analyse verschiedener phänotypischer Parameter (Gram-Färbung, Begeißelung, stoffwechsel-physiologische Leistungen etc.). Besondere Anerkennung und Bedeutung hat die Fettsäureanalyse gewonnen. Die typischen Profile der gaschromatographischen Trennung der Fettsäuren der Mikroorganismen gestatten in der Regel eine Art- oder sogar Pathovarietäten- und Serotypen-Identifikation. Der hierfür nötige apparative Aufwand ist allerdings sehr hoch und nur für große Laboratorien realisierbar. Außerdem verlangt die notwendige Reinanzucht der Einzelkolonien einen erheblichen Zeit- und Materialaufwand.

Daneben gibt es Systeme, die eine ähnlich genaue Differenzierung und Identifikation von Mikroorganismen auf der Basis von Stoffwechselleistungen der Zellen versprechen. Abgesehen von häufigen Fehlinterpretationen ist dieses Verfahren wiederum mit dem schwerwiegenden Nachteil belastet, daß es nur an Reinkulturen zu verwertbaren Aussagen führt. Dies ist jedoch, wie erwähnt, eine aufwendige, langwierige und kostenintensive Aufgabe.

Ein weiterer Nachteil bekannter Identifikationssysteme besteht darin, daß bei der Untersuchung komplexer Proben eine Vielzahl von Mikroorganismen unerkannt bleibt, weil ihre Kultursprüche unbekannt sind.

Die Aufklärung von konservierten Sequenzabschnitten im Bereich der ribosomalen Gene bei Prokaryonten und ihre Nutzung für molekularbiologische Nachweistechniken (Hybridisierung bzw. Amplifikationsmethoden wie PCR) hat in den letzten fünf Jahren phylogenetische Zusammenhänge aufdecken können, die die Bakterientaxonomie entscheidend vorangebracht haben. Der Wert dieser Methode für diagnostische Aufgabenstellungen in der Bakteriologie ist heute bereits unbestritten.

Genutzt wird diese Technik gegenwärtig einerseits für taxonomische Fragestellungen. Hierbei werden vorrangig nach Amplifikation unter Nutzung hochkonservierter Primersequenzen die entstandenen Amplicons kloniert, sequenziert und ihre Homologie zu bekannten Sequenzen für die taxonomische Identifikation bzw. Einordnung eingeschätzt.

Andererseits werden auf der Basis derart gewonnener Sequenzinformationen Primer für diagnostische Aufgabenstellungen entworfen, um interessierende Organismen direkt nachweisen zu können. Es existieren mittlerweile vielfältige Protokolle für den Nachweis der unterschiedlichsten Mikroorganismen-Arten und Subtypen.

Der Nachteil dieses Standes der Technik besteht darin, daß entweder für jede diagnostische Aufgabenstellung eine individuelle Analyse oder aber bei der Charakterisierung von komplexen Gemischen aufwendige Genklonierungen durchgeführt werden müssen.

Unter Nutzung hochkonservierter Primersequenzen werden in komplexen Proben durch alternative Verfahren Teile der Erbinformation der vorhandenen Mikroorganismen amplifiziert und die Einschätzung der Probenkomplexität sowie die taxonomische Identifikation ihrer Bestandteile durch anschließende Analyse von Restriktionslängen-Polymorphismen vorgenommen. Dieser Auswertemodus ist als sehr aufwendig und wenig routenegeeignet einzuschätzen.

Das der Erfindung zugrunde liegende technische Problem besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, das eine sichere Bestimmung etwaiger in einer Probe befindlicher Mikroorganismen zuläßt, selbst wenn diese in einer Mischung mit Mikroorganismen verschiedenster Art vorliegen. Dabei soll das Verfahren neben hoher Sicherheit in der Bestimmung der Mikroorganismen auch einfach und kostengünstig durchzuführen sein.

Dieses Problem wird durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. Das erfundungsgemäß Verfahren ist zum Nachweis von interessierenden Mikroorganismen in einer den oder die interessierenden Mikroorganismus(men) enthaltenen Probe, in der ein Gemisch von Mikroorganismen vorliegen kann geeignet. Dabei werden molekularbiologische Techniken, wie Amplifikationsreaktionen eingesetzt. Erfundungsgemäß werden mindestens eine Hybridisierungssonde (A) die konservierte Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus(men) anzuzeigen in der Lage ist und mindestens eine Hybridisierungssonde (B), die weniger konservierte Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus(men) anzuzeigen in der Lage ist, zu der Probe gegeben mit der Maßgabe, daß pro interessierendem Mikroorganismus mindestens eine Hybridisierungssonde des Typs (A) und des Typs (B) vorhanden sein muß und die Probe sich in einem hybridisierungsfähigen Zustand befindet. Durch ein entstehendes Hybridisierungsmuster erfolgt eine Identifikation des oder der interessierenden Mikroorganismen.

Durch die Verwendung von Hybridisierungssonden, die mikrobiellen Nucleinsäuresequenzen unterschiedlichen Konservierungsgrades entsprechen, wird der Nachweis und die Identifikation von Mikroorganismen ermöglicht, die sich in einer Mischprobe befinden, ohne daß für die Identifikation eine Trennung z. B. durch Einzelkolonie-Passagen notwendig ist. Hierbei wird eine Kombination aus allgemeiner Keimbestimmung auf Basis hochkonservierter Sequenzabschnitte und individuell definierbarer Spezifizierung durch weniger konservierte Sequenzabschnitte vorgenommen.

Vorzugsweise werden zur Gewährleistung einer ausreichenden Sensitivität des Tests unter Nutzung der Hybridisierungssonden als Startermoleküle Teile der Erbinformation in vitro amplifiziert (z. B. durch PCR).

Erfundungsgemäß werden vorzugsweise die Hybridisierungssonde(n) A als Starter für die Amplifikation und die Hybridisierungssonde(n) B zur Detektion genutzt. Es ist aber ebenfalls möglich, die Hybridisierungssonde(n)

B als Starter für die Amplifikation und die Hybridisierungssonde(n) A zur Detektion, die Hybridisierungssonde(n) A und B als Starter für die Amplifikation und die Hybridisierungssonde(n) B zur Detektion oder die Hybridisierungssonde(n) A und B als Starter für die Amplifikation und die Hybridisierungssonde (n) A zur Detektion zu nutzen.

Diese Starter-Hybridisierungssonden (Primer) entsprechen entweder denjenigen hohen Konservierungsgrades oder aber denjenigen hoher Spezifität, während für die Detektion Hybridisierungssonden des jeweilig entgegengesetzten Konservierungsgrades verwendet werden.

Der Vorteil dieser Ausführungsform besteht darin, daß auf diese Weise die gewünschte Verknüpfung von Amplifikation und Detektion mit den Hybridisierungssonden engerer und breiterer Spezifität realisiert wird.

Vorteilhafterweise erfolgt ein Teil des Verfahrens an einer festen Phase durch Bindung eines Teils der Hybridisierungssonden, wobei die Kopplung der entsprechenden Hybridisierungssonde(n) an die feste Phase nach der Amplifikation erfolgt oder daß die Kopplung der entsprechenden Hybridisierungssonde(n) an die feste Phase vor der Amplifikation erfolgt und die Amplifikation zumindest teilweise an der festen Phase verläuft. Dies hat den Vorteil, daß auf einfache Weise die gebildeten Komplexe aus Amplifikat und Detektionssonde von sonstigen Komponenten vorangegangener Reaktionsstufen getrennt werden können.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens befindet oder befinden sich die weniger konservierte(n) Sequenz(en), die der (den) Hybridisierungssonde (n) B entspricht (entsprechen), zwischen den konservierten Sequenzbereichen, die der (den) Hybridisierungssonde (n) A entspricht (entsprechen) oder die konservierte (n) Sequenz(en), die der(den) Hybridisierungssonde(n) A entspricht (entsprechen), befindet oder befinden sich zwischen den weniger konservierten Sequenzbereichen, die der (den) Hybridisierungssonde(n) B entspricht (entsprechen). Vorteilhaft ist dies, weil eine zusätzliche Selektion der sequenzrichtigen Amplifikation erreicht wird.

Insbesondere kann erfindungsgemäß die Amplifikation simultan mit mehreren Starterpaaren auf gleichzeitig mehreren Targetsequenzen durchgeführt werden. Dieses bietet den Vorteil, in einer Reaktion auch solche Mikroorganismen gleichzeitig zu amplifizieren, für die keine hinreichend übereinstimmenden Hybridisierungssonden als Starter existieren.

Es ist erfindungsgemäß ebenfalls möglich, die Detektion simultan mit mehreren verschiedenen Sonden durchzuführen, um vorteilhafterweise, entsprechend der analytischen Aufgabenstellung, Gruppen von Mikroorganismen detektieren zu können, ohne daß entsprechende Hybridisierungssonden dieser Gruppenspezifität zur Verfügung stehen müssen.

Ribosomale Gensequenzen haben sich als besonders geeignet erwiesen, im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt zu werden. Ribosomale Gensequenzen bieten den Vorteil, daß sie hochkonservierte und weniger konservierte Abschnitte in der hier interessierenden bevorzugten engen Nachbarschaft aufweisen. Ein weiterer Vorteil der Verwendung dieser Gensequenzen besteht darin, daß ribosomale Gene in mehreren Kopien je Genom von Mikroorganismen existieren, was zu einer vergleichsweise höheren Sensitivität des erfindungsgemäßen Assays beiträgt.

Durch Temperatur, Ionenstärke und andere insbesondere die Wasserstoffbrückenbildung beeinflussende Faktoren können die Hybridisierungsbedingungen jeweils so stringent gewählt werden, daß die für die Aussage des Verfahrens erforderliche Spezifität der Hybridisierungsreaktion(en) zwischen Targetsequenz und den Hybridisierungssonden gewährleistet wird.

Wie die Stringenz im einzelnen zu wählen und einzustellen ist, kann der Fachmann mit ihm bekannten Mitteln festgestellt werden (vergl. U. Wobus, "Isolierung, Fraktionierung und Hybridisierung von Nukleinsäuren", Akademie-Verlag, Berlin, 1981, 229 Seiten).

Die Auswahl der Hybridisierungssonden erfolgt in Abhängigkeit von der analytischen Aufgabenstellung. Es sind sowohl allgemeine Keimzahlbestimmungen in Kombination mit der Detektion spezieller Arten als auch die Analyse und Charakterisierung sehr komplex zusammengesetzter Proben möglich.

Die Erfindung wird an dem folgenden Beispiel näher erläutert. Es sollten aus einer Gemischprobe mit insgesamt 4 verschiedenen Mikroorganismen *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* nachgewiesen werden.

Beispiel

Das Vorgehen gliederte sich in folgende Etappen:

1. Auswahl der Sequenzen für die Sonden
2. Probenvorbereitung
3. PCR-Amplifikation
4. Detektion

1. Auswahl der Sequenzen für die Sonden

Die Hybridisierungssonden A mit Breitband-Spezifität dienten zur Amplifikation aller in der Untersuchungsprobe vorhandenen Bakterien und entsprachen einem hochkonservierten Abschnitt der ribosomalen 16S rDNA nach Stackebrandt und Liesack (Handbook of New Bacterial Systematics, p 151 – 193, 1993):

16S-rDNA Primer zur Amplifikation

10-30f: GAG TTT GAT CCT GGC TCA G

5 530r: GTA TTA CCG CGG CTG CTG

Hybridisierungssonden B

10 Die Hybridisierungssonden B mit engerer Spezifität dienten als Detektionssonden.

Zur Auswahl der geeigneten Detektionssonden wurden Datenbankrecherchen durchgeführt. Auf diese Weise konnte unter anderem gezeigt werden, daß die ausgewählten Sonden spezifisch für den jeweiligen Organismus sind. Dabei ergaben sich folgende Sequenzen:

15 Escherichia coli: AAC GUC GCA AGA CCA AAG

Bacillus subtilis: GGT TGT TTG AAC CGC ATG GTT

20 Die Sonden wurden zur Detektion mittels ELISA-Reader am 5'Ende biotinyliert. Dadurch konnte nach Zugabe einer Streptavidin-konjugierten Peroxidase ein Farbumschlag detektiert werden (Soumet et al., Bio-Techniques 19 : 792-796 (1995)).

25 Beide Sonden wurden in 5 getrennten Versuchen auf ihre Spezifität hin überprüft, indem jeder Organismus mit den eigenen sowie den für den anderen Organismus spezifischen Sonden kontrolliert wurde.

Außerdem wurden die Sonden an vier weiteren Mikroorganismen getestet. Dabei ergaben sich keine Kreuzreaktionen.

2. Probenvorbereitung

30 Zunächst wurden in gepuffertem Peptonwasser die Keime angezüchtet und anschließend aus dieser Gemischprobe die DNA aller Organismen mittels eines DNA-Isolierungskits isoliert.

3. PCR-Amplifikation

35 Für die PCR-Amplifikation wurde ein Primer (530r, s. o.) nach Anweisung der Firma Nunc kovalent an die Kavität der CovaLink™-Platte gebunden.

Dazu wurde in jede Kavität ein Gemisch aus 100 ng des zuvor am 5'-Ende phosphorylierten 530r-Primers, gelöst in 75 µl 13 mM 1-methyl-imidazol, gegeben. Hinzugefügt wurden 25 µl frisch angesetzte 40 mM 1-Ethyl-4-(3-Di-methylaminopropyl)carbodiimide (EDC). Die Platte wurde dann bei 50°C für 5 Stunden inkubiert und dreimal bei 50°C mit 0.4 N NaOH, 0.25% Tween 20 gewaschen. Es folgte eine 5-minütige Inkubation mit der Waschlösung, woran sich weitere drei Waschungen anschlossen. Als letzte Waschlösung wurde deionisiertes Wasser eingesetzt.

40 Zur Amplifizierung der 16S-rDNA wurde die Methode nach Stackebrandt und Liesack (Handbook of New Bacterial Systematics, p 151–193, 1993) leicht modifiziert. Folgende PCR-Bedingungen wurden in der PCR eingesetzt:

50 Reaktionskomponen-ten: Reaktionsansatz: Cyclerbedingungen:

55 10x Reaktionspuffer:	5 µl Reaktionspuffer 10µl dNTP	94°C 3 min 1 Zyklus
55 2M Tris	0.5µM Primer 10-30f	93°C 1 min
60 100 mM MgCl ₂	0,06µM Primer 530r	55°C 1 min
60 1M (NH ₄) ₂ SO ₄	5µl DNA	74°C 1 min
65 1% Tween	2,5 U Taq	28 Zyklen
65 dNTP-Mix: jeweils 1M	add 50µl steriles Wasser	74°C 10 min 4°C hold
Steriles Wasser		1 Zyklus

4. Detektion

Nach Beendigung der PCR wurde nach dem Protokoll der Firma Nunc weiterverfahren und die Hybridisierung der Detektionssonden durchgeführt. 5

Nach der Amplifikation wurden die Kavitäten trockengesaugt und zweifach mit 0,2 M NaOH, jeweils mit 5-minütiger Inkubation, gewaschen. Anschließend wurde zweifach mit Hybridisierungslösung (&x standard saline citrate [SSC], 5x Denhardt's Lösung, 100 µg/ml gescherter und denaturierter Heringssperma-DNA) gewaschen. Für die Hybridisierung wurden die biotinylierten Hybridisierungssonden auf eine Konzentration von 0,1 nmol/L in Hybridisierungslösung eingestellt und in 100 µl-Aliquots in die Kavitäten gefüllt. Die Hybridisierungsreaktion lief bei 37°C für 3 h. Danach wurden drei Waschschritte bei 37°C durchgeführt. Das erste Mal mit 2x SSC, 0,1% Tween 20 für 20 Minuten. Die beiden anderen Male mit 0,1 x SSC, 0,1% Tween 20 für jeweils 10 20 Minuten.

Anschließend wurde die Streptavidin konjugierte Peroxidase dazugegeben. Die Peroxidase (Sigma Chemica, St. Louis, MO, USA) wurde in SPO-Lösung (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,05% Tween 20) 1:1000 verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung wurden in jede Vertiefung gegeben. Die Platte wurde bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit SPO-Lösung gewaschen. 15

Als Substrat wurden 100 µl TMB-Lösung (1,5 mg/ml Tetramethylbenzidine, Sigma Chemica) in 25 mM Citronensäure, 50 mM NaH₂PO₄, 0,03% H₂O₂, 10% Dimethyl Sulfoxid [DMSO], pH 5,0) gelöst und dazugegeben. Nach 45 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion mit 25 µl 2M H₂SO₄ gestoppt und bei 450 nm am ELISA-Reader 20 25 gemessen.

Die zu beobachtenden Farbveränderungen in den einzelnen Kavitäten waren der Indikator für das Vorhandensein derjenigen Bakterienart in der Untersuchungsprobe, der die zugesetzte Detektionssonde entsprach. 25

Es konnte so gezeigt werden, daß sich aus einem Gemisch von verschiedenen Mikroorganismen ohne Herstellung einer Reinkultur individuelle Arten eindeutig nachweisen lassen. 25

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von interessierenden Mikroorganismen in einer den oder die interessierenden Mikroorganismus(men) enthaltenen Probe, in der ein Gemisch von Mikroorganismen vorliegen kann, mittels molekularbiologischer Techniken, wie Amplifikationsreaktionen, wobei mindestens eine Hybridisierungssonde (A) die konservierten Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus(men) anzuziegen in der Lage ist und mindestens eine Hybridisierungssonde (B), die weniger konservierten Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus(men) anzuziegen in der Lage ist, zu der Probe gegeben werden mit der Maßgabe, daß pro interessierendem Mikroorganismus mindestens eine Hybridisierungssonde des Typs (A) und des Typs (B) vorhanden sein muß, sich die Probe in einem hybridisierungsfähigen Zustand befindet und durch ein entstehendes Hybridisierungsmuster eine Identifikation des oder der interessierenden Mikroorganismen erfolgt. 30 35 40
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für ausreichende Sensitivität Teile der Erbinformationen *in vitro* amplifiziert werden.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungssonde(n) A und/oder B als Starter für die Amplifikation und die Hybridisierungssonde(n) B oder A zur Detektion genutzt werden. 45
4. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sich die weniger konservierte(n) Sequenz(en), die der(den) Hybridisierungssonde(n) B entspricht (entsprechen), zwischen den konservierten Sequenzbereichen, die der (den) Hybridisierungssonde(n) A entspricht (entsprechen), befindet. 50
5. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sich die konservierte(n) Sequenz(en), die der(den) Hybridisierungssonde(n) A entspricht (entsprechen), zwischen den weniger konservierten Sequenzbereichen, die der (den) Hybridisierungssonde(n) B entspricht (entsprechen), befindet. 55
6. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Hybridisierungssonden an einer festen Phase gekoppelt ist.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplung der entsprechenden Hybridisierungssonde(n) an die feste Phase nach der Amplifikation erfolgt.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplung der entsprechenden Hybridisierungssonde(n) an die feste Phase vor der Amplifikation erfolgt und die Amplifikation zumindest teilweise an der festen Phase verläuft. 60
9. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikation simultan mit mehreren Starterpaaren auf gleichzeitig mehreren Targetsequenzen durchgeführt wird.
10. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion simultan mit mehreren verschiedenen Sonden erfolgt.
11. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungssonden Teile von ribosomalen Gensequenzen sind. 65
12. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungsbedingungen durch Temperatur, Ionenstärke und andere die Wasserstoffbrückenbildung beeinflussende Faktoren jeweils so

DE 196 16 750 A

stringent gewählt werden, daß die für die Aussage des Verfahrens erforderliche Spezifität der Hybridisierungsreaktion(en) zwischen Targetsequenz und den Hybridisierungssonden gewährleistet wird.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65